

論文審査の結果の要旨

博士の専攻分野の名称	博士（ 医学 ）	氏名	白石 勝範
学位授与の条件	学位規則第4条第①・2項該当		
論文題目			
Quality Evaluation of Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells for Cartilage Repair (軟骨修復のためのヒト骨髄間葉系幹細胞の品質評価)			
論文審査担当者			
主査	教授	東 幸仁	印
審査委員	教授	檜山 英三	
審査委員	講師	宮本 達雄	
<p>〔論文審査の結果の要旨〕</p> <p>ヒト骨髄間葉系幹細胞はヘテロな細胞集団で性質にバラツキがあるため、今後の製品化を目指す上で有効性に基づく細胞品質評価が求められる。臨床研究では間葉系幹細胞の生存率や表面マーカーによる品質評価が行われているが、実用化には細胞製品としての規格化が必要である。しかし再生医療製品としての有効性に基づく間葉系幹細胞の品質評価基準はいまだ存在しない。そこで、本研究では骨髄間葉系幹細胞の軟骨修復能と相関する品質評価基準の探索を目的とした。</p> <p>5種類のロットのヒト骨髄間葉系幹細胞を実験に用いた。まず、<i>in vitro</i>での細胞増殖能と軟骨分化能を評価した。細胞増殖能の評価では、増殖速度として5,000個/cm<sup>2</sup>播種での5日間の分裂速度を計測し、さらにT75フラスコに1500個のヒト骨髄間葉系幹細胞を播種して14日間培養し、コロニー数を計測するコロニーアッセイを行った。軟骨分化能はペレットカルチャーでの軟骨分化誘導で評価した。ペレットのトルイジンブルー染色を行い、メタクロマジー領域の面積を計測して軟骨基質産生能を定量化した。一方、<i>in vivo</i>での軟骨修復能として、ヌードラットの膝関節軟骨欠損モデルにヒト骨髄間葉系幹細胞を移植し、12週後にWakitaniスコアによる組織学的評価を行った。さらに、ヒト骨髄間葉系幹細胞よりtotal RNAを、培養上清よりタンパクをそれぞれ抽出し、マイクロアレイとreal-time PCRによるmRNAおよびmiRNAの網羅的発現解析とELISAによる軟骨形成関連因子のタンパク発現解析を行い、<i>in vitro</i>での細胞機能や<i>in vivo</i>での軟骨修復能との関連を調査した。</p> <p><i>In vitro</i>でのヒト骨髄間葉系幹細胞の増殖速度と軟骨分化能との間に正の相関を認めた。mRNAの発現で、MYBL1は増殖能および軟骨分化能と正の相関を、RCAN2は</p>			

負の相関を認めた。タンパクでは TIMP1, VEGF の発現と増殖能および軟骨分化能との間に負の相関を認めた。一方、*in vivo* での軟骨修復はすべてのロットのヒト骨髄間葉系幹細胞移植によって有意に促進され、軟骨修復能にロット間でのバラツキはあったものの有意差は認めなかった。Wakitani スコアと HLA-DRB1 の発現が正の相関を、TMEM155、miR-486-3p、miR-148b、miR-93、miR-320B の発現が負の相関を示した。*In vivo* での軟骨修復能と *in vitro* での増殖能や軟骨分化能との間に相関関係は認められなかった。

骨髄間葉系幹細胞の増殖能および軟骨分化能は *in vivo* の軟骨修復能とは相関しなかったことより、増殖能と軟骨分化能が生体内で軟骨再生能の有効性に基づく骨髄間葉系幹細胞の品質評価に使用できないことがわかった。増殖能および軟骨分化能に関連する MYBL1、RCAN2、TIMP-1、VEGF は、一般的な骨髄間葉系幹細胞としての品質評価には使用可能だが、軟骨修復のための製品としての品質評価には使用できないと考えられる。一方、軟骨修復の組織学的評価に相関を示した HLA-DRB1、TMEM155、miR-486-3p、miR-148b、miR-93、miR-320B が軟骨修復能に基づく細胞品質評価に使用できる可能性が考えられる。

Psaltis や Buxton らは、骨髄間葉系幹細胞移植によって促進される組織再生は、移植された骨髄間葉系幹細胞の軟骨分化による直接的な組織形成よりもむしろ間接的なパラクライン・メカニズムにより促進される可能性があると報告している。そのため骨髄間葉系幹細胞の *in vitro* での増殖能と軟骨分化能が *in vivo* での軟骨修復能に影響しなかった可能性がある。一方でこの *in vivo* での軟骨修復に相関を示した因子は、軟骨再生治療に用いる再生医療製品としての骨髄間葉系幹細胞の品質評価に寄与する可能性がある。

骨髄間葉系幹細胞の増殖能および軟骨分化能は *in vivo* の軟骨修復能とは相関しないことが明らかとなった。*In vivo* での軟骨修復能と相関する因子は HLA-DRB1、TMEM155、miR-486-3p、miR-148b、miR-93、miR-320B が存在し、この因子は骨髄間葉系幹細胞を用いた軟骨再生治療前の骨髄間葉系幹細胞の品質評価に寄与する可能性がある。

以上の結果から、本論文は軟骨修復と相関するヒト骨髄間葉系幹細胞由来の因子が軟骨修復を目的としたヒト骨髄間葉系幹細胞の品質評価に利用できる可能性があり、整形外科学領域の発展に資すること大である。

よって審査委員会委員全員は、本論文が著者に博士（医学）の学位を授与するのに十分な価値あるものと認めた。

最終試験の結果の要旨

博士の専攻分野の名称	博士（ 医学 ）	氏名	白石 勝範
学位授与の条件	学位規則第4条第①・2項該当		
論文題目			
Quality Evaluation of Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells for Cartilage Repair (軟骨修復のためのヒト骨髄間葉系幹細胞の品質評価)			
最終試験担当者			
主査	教授	東 幸仁	印
審査委員	教授	檜山 英三	
審査委員	講師	宮本 達雄	
〔最終試験の結果の要旨〕			
判 定 合 格			
上記3名の審査委員会委員全員が出席のうえ、平成29年8月3日の第70回広島大学研究科発表会（医学）及び平成29年7月31日の本委員会において最終試験を行い、主として次の試問を行った。			
1. Wakitani スコアを用いた軟骨修復の評価方法			
2. <i>In vivo</i> と <i>in vitro</i> で抽出した因子間の関連			
3. 本研究における軟骨修復に関連した因子の過去の報告			
4. <i>In vitro</i> の増殖能や軟骨分化能と <i>in vivo</i> の軟骨修復能に関連がない理由			
5. 本研究の臨床応用			
これらに対して極めて適切な解答をなし、本委員会が本人の学位申請論文の内容及び関係事項に関する本人の学識について試験した結果、全員一致していずれも学位を授与するに必要な学識を有するものと認めた。			